

課題番号 : 26指110

研究課題名 : 摂食応答を標的とした消化管炎症の制御法の開発研究

主任研究者名 : 河村 由紀

分担研究者名 : 鈴木 春巳、高木 智

キーワード : 炎症性腸疾患、栄養シグナル、肥満、粘膜免疫

研究成果 :

炎症性腸疾患(IBD)では成分栄養療法が有効であり、腸内環境がその病因・病態形成に重要である事は明確である。本研究ではIBDの臨床検体とマウス腸炎モデルを用いて、栄養状態が消化管炎症に及ぼす影響を、免疫細胞、炎症再生上皮の遺伝子発現・エピゲノム修飾の網羅的解析によって分子レベルで解明する。更にその成果を基に、IBDの新たな診断・治療法を開発することを目的とする。

マウス腸炎モデルを用いた検討では、絶食-再摂食が上皮傷害やその再生にどのような影響を及ぼすか検討した。2%デキストラン硫酸(DSS)を5日間飲水内投与する腸炎モデルの一部で、day 7-8 まで36時間の絶食とし、その後通常飼料CE2あるいはグルコースと塩の粉末混合物ORSを再摂食させた。体重変化には3群の間に有意差は認められなかったが、絶食-CE2再摂食群では体重の回復傾向が認められた。CE群は、ORS群や非絶食群より大腸長が長く、day 9に採取した組織所見でも潰瘍形成が軽度であり、単位腸管あたりのクリプト数で比較した上皮細胞の修復は他群に比べ有意に高かった。すなわち、大腸炎の回復期に適切な絶食時期をもうけるだけで、炎症の緩和と修復を促進することが可能という驚くべき結果が得られた。

免疫細胞への影響については、マウスを36時間の絶食後、消化管二次リンパ組織の細胞数と細胞構成を調べた。絶食後に細胞数は約半数から30%程度まで減少し、小腸を長軸方向に3等分した部位別に見ると、中間部に存在するパイエル板の細胞減少が最も顕著であった。一方、Cecal patch及びcecal follicleの大きさが増大していた。さらに、小腸下部に存在するパイエル板では、絶食によりB細胞が減少し、組織学的には濾胞の扁平化と、CD11c<sup>+</sup>樹状細胞の局在変化も観察された。これらはパイエル板、cecal patchなど消化管二次リンパ組織の細胞数が、管腔内の栄養源からのシグナルに依存することを示唆する結果であり、免疫担当細胞分布の変化は炎症反応にも大きく影響すると予測される。

肥満の影響については、高脂肪食摂取マウスの消化管組織を観察した結果、形態的に明らかな変化が胃に見られた。20~30%の頻度で粘液産生細胞の胃粘膜における配置異常が認められ、その一部は経口抗生剤による細菌叢除去の影響を受けることがわかった。癌の疫学的リスク要因を考慮しアルコール投与を加えたが、胃・食道の表層性の急性炎症誘導にとどまった。塩酸+胆汁酸の飲水内投与でも高脂肪食で誘導される変化の程度や頻度は亢進しなかった。従って、肥満における細胞動態・分化能の異常は物理的な傷害刺激よりは代謝異常による細胞内シグナルの変化が原因であると推測された。

ヒト検体を用いた検討については、これまでに行ってきたIBDの網羅的解析結果を用い、トランスクリプトームとプロモーター領域のエピゲノム修飾との統合解析を試みている。症例間の個人差が予想以上に大きいため、IBD特異的变化を有する遺伝子の絞り込みの条件をさらに検討している。平行して肥満または糖尿病手術症例及び対照非合併症例の検体も収集している。

Subject No. : 26-110

Title : Identification and regulation of nutritional stimuli-inducing signaling pathways in gastrointestinal inflammation

Researchers : Yuki I. Kawamura, Harumi Suzuki, Satoshi Takaki

Key word : Inflammatory Bowel Diseases, nutrient signal, obesity, mucosal immunology

Abstract :

As elemental diets are effective therapy for inflammatory bowel disease (IBD), intraluminal environment including ingested food, indigenous flora, bacterial component, microbial metabolites and fermentation products closely related to the etiology and pathophysiology of IBD. The aim of this project is to identify the nutritional stimuli-inducing signaling pathways related to gastrointestinal inflammation, and eventually to apply the result to the development of remedies against IBD.

In this project, we elucidated the influence of starvation and refeeding on epithelial cell damage and regeneration using murine colitis models. Mice were provided drinking water supplemented with dextran sulfate sodium (DSS) at the concentration of 2% for over 5 days, followed by 3 days of regular water. The starvation was started on day 7. After starvation of 36 h, mice were re-fed with normal diet (CE2) or oral rehydration salts (ORS), a mixture of salts and glucose. Starvation-re-fed mice showed marked suppression of mucosal inflammation and acceleration of cell proliferation in DSS-damaged mucosa when compared with control (non-starved) and ORS-re-fed mice. These results indicate that starvation during the critical phase of recovery period may ameliorate intestinal inflammation and promote regeneration of damaged epithelium.

We further elucidated the influence of the dietary induced-response on immune cells. Starvation for 36 h dramatically decreased the number of cells in Peyer's patches (PP). In contrast, the sizes of cecal patches and follicles were enlarged after starvation. In addition, we found the significant decrease in the number of B cells and the change in the localization of CD11c<sup>+</sup> dendritic cells in PP located in the lower part of small intestine after starvation. These results indicate that dietary induced-signaling affect maintenance of the number of immune cells in gut-associated lymphoid tissues, such as PP, cecal patches and follicles.

We also analyzed the gastrointestinal tract of mice with high fat diet (HFD)-induced obesity and found macroscopically distinct white patchy lesions in stomach. Histological analysis demonstrated that feeding of HFD increased gastric corpus mucosal thickness and decreased the number of parietal cells expressing HK-ATPase, a parietal cell marker. White patchy lesions were characterized by severe parietal cell loss and the expression of ectopic Alcian blue-positive mucin, which resembled the previously reported spasmodic polypeptide expressing metaplasia (SPEM). The administration of antibiotics in drinking water prevented HFD-induced increase in the corpus mucosal thickness, suggesting that the mucosal hypertrophy may be dependent on microbiota. Because bile acid reflux has been thought to facilitate esophageal and gastric carcinogenesis, we administered deoxycholic acid (DCA) in drinking water together with HFD feeding. This treatment did not affect the development of cell metaplasia. These results indicate that HFD alone could induce atrophic changes and metaplasia of proximal gastric mucosa in mice.

To find out the nutritional stimuli-inducing signaling pathway related to gastrointestinal inflammation by using global gene expression profiles and epigenome data obtained from IBD samples, we have tried to establish the method of in silico integrated analysis. Bioinformatics is now underway.

Researchers には、分担研究者を記載する。

# 摂食応答を標的とした消化管炎症の制御法の開発研究

26年度の達成状況

平成26年度

## A. マウス絶食-再摂食モデルを用いた栄養シグナルによる免疫・炎症機構の解明

絶食によるパイエル板細胞数と細胞構成の変化を見いだした。

適切な絶食の誘導により消化管炎症を緩和出来ることを見いだした。

平成27年度

摂食応答に関連する代謝シグナル関連分子の機能解析  
粘膜免疫、炎症におけるメカニズム解析

平成28年度

## B. 肥満マウスモデルを用いた栄養シグナルによる免疫・炎症機構の解明

肥満マウスでの消化管粘膜の異常を見いだした。一部には常在菌の関与も見られた。

栄養シグナル攪乱が病態(腸炎・胃食道炎)に及ぼす影響  
肥満により消化管粘膜および免疫系に異常を来す原因の解明

## C. ヒト炎症性腸疾患検体を用いた栄養シグナル異常の探索

トランスクリプトーム、網羅的エピゲノム解析結果の統合解析中

マウスモデルで見出された栄養シグナル関連分子の変化が、ヒト検体でも見られるか否かを検証  
新規標的分子の*in vitro*、*in vivo*メカニズム解析

## D. 新規標的分子のヒト検体を用いた検証ならびに機能・メカニズム解析

手術標本、生検、血清検体の収集

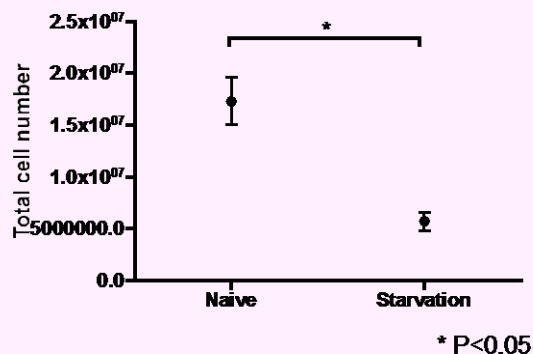
順調に検体を集積している

新規標的分子発現ならびに関連するエピゲノム変化の病勢・治療応答性との関連を検証

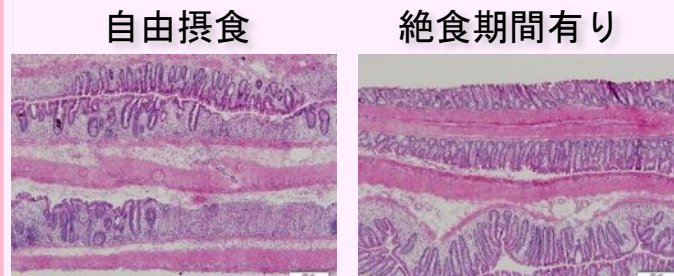
# 研究の経過

## 26年度の主な成果

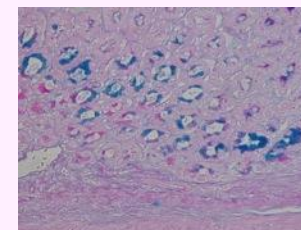
### 絶食-再摂食によるパイエル板内細胞の変化



### 絶食による大腸炎の軽減



### 高脂肪食摂取により肥満マウスに誘導される胃粘膜の変化



- 消化管の炎症に関連する栄養シグナル経路の同定  
絶食-再摂食、高脂肪食、成分栄養の比較  
抗生剤投与、無菌マウスを用いた腸内細菌層、菌代謝物関与の検討
- ヒト検体(潰瘍性大腸炎、クローン病)における異常の検証  
臨床情報との関連性  
同一患者の生検を用いた経時的・比較解析

In silico 解析中

臨床検体集積中

- 新規標的分子の機能・メカニズム解明
- 分子メカニズムに基づく診断・治療法の開発

課題番号 : 26指110

研究課題名 : 消化管の炎症病理における栄養シグナルの関与

主任研究者名 : 河村 由紀

分担研究者名 : 鈴木 春巳

キーワード : 炎症性腸疾患、栄養シグナル、炎症病理

研究成果 :

炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）は腹痛・発熱などを繰り返し、病状の寛解・再燃は長期にわたり患者を苦しめる。内科的治療として5アミノサリチル酸製剤、ステロイド、TNF- $\alpha$ 中和生物製剤、免疫調節剤が用いられているが、長期間の治療中にこれらのいずれにも応答しない、あるいは次第に応答性を失っていく症例が多く、現時点で根治療法はない。一方で、炎症性腸疾患の治療として成分栄養療法が有効であり、栄養療法からの離脱が病勢再燃の引き金となることから、栄養状態が炎症性腸疾患の病因・病態形成に重要である事は明確であるが、栄養シグナルが消化管の炎症病理をどのように修飾しているのか、その分子メカニズムは明らかとなっていない。消化管の炎症に関連する栄養シグナルを同定することが出来れば、攪乱されている栄養シグナルの是正を標的とする、既存の治療法とは異なる分子機構に基づく予防・治療法の開発に繋がることが期待されるため、消化管の炎症病理に関連する栄養シグナルの同定は喫緊の課題である。本研究ではマウスに高脂肪食摂取またはカロリー制限を行うモデルを用いることで、摂食状態が消化管の炎症病理を修飾する分子メカニズムを解明する。

初年度は、C57BL/6マウスに高脂肪食（60% kcal% fat）を8～20週間自由摂取させた後、消化管組織を観察した。その結果、形態的に明らかな変化が見られるのは胃であることがわかった。すなわち、高脂肪食摂取マウスでは、20～30%の頻度で粘液産生細胞の胃粘膜における配置異常が認められた。高脂肪食摂取マウスにさらに抗生剤を経口投与することで細菌叢除去を行ったところ、高脂肪食摂取による粘液産生細胞の配置異常は細菌叢除去の影響を受けることが明らかとなった。そこで、食道癌や、胃噴門部癌の疫学的リスク要因も考慮し、高脂肪食摂取マウスにさらにアルコール投与、または塩酸+胆汁酸の投与を加え、食道・胃粘膜の変化を組織学的に解析した。高脂肪食+アルコール投与では胃・食道の表層性の急性炎症誘導にとどまった。また、高脂肪食摂取マウスに対する塩酸+胆汁酸の飲水内投与によっても高脂肪食で誘導される粘液産生細胞の配置異常の程度や頻度は亢進しなかった。従って、肥満における胃粘膜細胞の動態・分化能の異常は、表層からの物理的な傷害刺激よりは代謝異常による細胞内シグナルの変化が原因で惹起されると推測された。高脂肪食摂取マウスの胃で見られる粘液産生細胞の配置異常の頻度は20～30%と低いため、粘液産生異常までには至らないものの、正常の胃底腺細胞分布から逸脱する変化を検出する方法を確立した。現在、この指標に基づいて更に詳細な検討を進めている。

課題番号 : 26指110

研究課題名 : 栄養シグナルによる粘膜免疫制御

主任研究者名 : 河村 由紀

分担研究者名 : 高木 智

キーワード : 炎症性腸疾患、栄養シグナル、免疫制御

研究成果 :

炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）は、若年発症の重篤な慢性炎症性疾患である。炎症性腸疾患は近年著しい増加傾向にあり、生活様式の変化（食生活の欧米化、特に肉食の増加、衛生状態の改善など）がその一因と考えられている。しかしながら、食事内容の欧米化や衛生状態の改善に伴う腸内環境の変化が、炎症性腸疾患の発症・遷延化をどのように修飾しているのか、その分子メカニズムは明らかとなっていない。炎症性腸疾患の治療として成分栄養療法が有効であることも栄養シグナルの病因・病態形成における重要性を示唆しているが、一方で長期にわたる栄養療法のコンプライアンスは低く、QOLの改善にもつながらない。また、栄養療法からの離脱が病勢再燃の引き金となることも多い。炎症性腸疾患に関連する栄養シグナル異常が同定され、既存の治療法とは異なる分子機構に基づく予防・治療法開発により栄養シグナル異常がコントロール可能となれば、患者は厳格な食事制限から解放されることが期待される。QOLの著しい改善という点でも、摂食刺激により炎症応答が引き起こされるメカニズムの解明が急務である。初年度はマウスに絶食-再摂食などの摂食状態の変化を起こすモデルを用いることで、栄養関連シグナルが消化管粘膜免疫系に及ぼす影響を詳細に解析した。

マウスを36時間の絶食後、腸管関連リンパ組織を採取し、粘膜免疫担当細胞を分離した後、その細胞数、細胞構成、分布に及ぼす影響を検討した。腸管関連リンパ組織としては小腸のパイエル板（小腸の部位別に採取）、盲腸のcecal patchおよびリンパ濾胞を採取し、その細胞数を算定するとともに、フローサイトメトリーにより細胞構成を解析した。その結果、36時間の絶食後に細胞数は約半数から30%程度まで減少することが明らかとなった。小腸を長軸方向に3等分した部位別に見ると、中間部に存在するパイエル板における細胞の減少が最も顕著であった。一方で、Cecal patchおよびcecal follicleの大きさは絶食後に増大していた。盲腸管腔内の環境はもともと食物由来の栄養素に乏しく、腸内細菌とその代謝産物で占められることを考慮すると、パイエル板、cecal patchなどの消化管二次リンパ組織の細胞数が、管腔内の栄養源からのシグナルに依存することを示唆していると考えられる。細胞構成の変化としては、小腸下部に存在するパイエル板において、絶食によりB細胞の減少が認められた。組織学的には濾胞の扁平化と、CD11c<sup>+</sup>樹状細胞の局在変化も観察された。これらの管腔内の栄養源からのシグナルに依存した粘膜免疫担当細胞構成や分布の変化は、炎症反応にも大きく影響すると予測される。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：26指110

研究課題名：摂食応答を標的とした消化管炎症の制御法の開発研究

主任研究者名：河村由紀

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 is associated with colitis but not tumors in a murine colitic cancer model.	Otsubo T, Hagiwara T, Okamura T, Ishizaka Y, Kawamura YI, Dohi T.	PLOS ONE	10	2015
Aberrant DNA hypermethylation reduces the expression of the desmosome-related molecule periplakin in esophageal squamous cell carcinoma.	Otsubo T, Hagiwara T, Tamura-Nakano M, Sezaki T, Miyake O, Hinohara C, Shimizu T, Yamada K, Dohi T, Kawamura YI.	Cancer Medicine	4	2015
Pathological activation of canonical nuclear-factor $\kappa$ B by synergy of tumor necrosis factor $\alpha$ and TNF-like weak inducer of apoptosis in mouse acute colitis.	Dohi T, Kawashima R, Kawamura YI, Otsubo T, Hagiwara T, Amatucci A, Michaelson J, Burkly LC.	Cytokine	69	2014
The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates functional expansion of colonic regulatory T cells.	Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Ohara O, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K.	Nature Immunology	15	2014
Therapeutic adenoviral gene transfer of a glycosyltransferase for prevention of peritoneal dissemination and metastasis of gastric cancer.	Kawamura YI, Adachi Y, Curiel DT, Kawashima R, Kannagi R, Nishimoto N and Dohi T.	Cancer Gene Ther	21	2014

研究発表及び特許取得報告について

The thymic cortical epithelium determines the TCR repertoire of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells.	Nitta T, Muro R, Shimizu Y, Nitta S, Oda H, Ohte Y, T Goto M, Yanobu R, Narita T, Takayanagi H, Yasuda H, Okamura T, Murata S, Suzuki H.	EMBO Rep	16	2015
The Ras GTPase-activating protein Rasal3 supports survival of naive T cells.	Muro R, Nitta T, Okada T, Ideta H, Tsubata T, Suzuki H.	PLoS ONE	10	2015
Overexpression of RhoH permits to bypass the pre-TCR checkpoint	Tamehiro N, Hiroyo Oda H, Shirai M, Suzuki H.	PLoS ONE	10	2015
Differential function of Themis CABIT domains during T cell development.	Okada T, Nitta T, Kaji K, Takashima A, Oda H, Tamehiro N, Goto M, Okamura T, Patrick MS, Suzuki H.	PLoS ONE	9	2014
Lnk/Sh2b3 controls the production and function of dendritic cells and regulates the induction of IFN- $\gamma$ -producing T cells.	Mori T, Iwasaki Y, Seki Y, Iseki M, Katayama H, Yamamoto K, Takatsu K, Takaki S.	J Immunol	193	2014
Lnk prevents inflammatory CD8+ T-cell proliferation and contributes to intestinal homeostasis.	Katayama H, Mori T, Seki Y, Anraku M, Iseki M, Ikutani M, Iwasaki Y, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S.	Eur J Immunol	44	2014
Nov/CCN3 regulates long-term repopulating activity of murine hematopoietic stem cells via integrin $\alpha\beta$ 3	Ishihara J, Umemoto T, Yamato M, Shiratsuchi Y, Takaki S, Petrich BG, Nakauchi H, Eto K, Kitamura T, Okano T.	Int J Hematol	99	2014



研究発表及び特許取得報告について

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Aberrant DNA methylation of a desmosome-related molecule in esophageal squamous cell carcinoma.	Hagiwara T, Otsubo T, Tamura-Nakano M, Yamada K, Hinohara C, Miyake O, Shimizu T, Dohi T, Kawamura YI.	第87回日本生化学会大会	京都	2014年9月
Sialic-acid-binding Ig-like lectins, potential peripheral markers for mucosal damage of inflammatory bowel disease.	Kawamura YI, Maeyashiki C, Hagiwara T, Otsubo T, Akiyama J, Dohi T.	United European Gastroenterology 2014	Vienna	2014年10月
Intestinal mucosal injury induced by anti-cancer agents is mediated by TWEAK/Fn14 and IL-13.	Sezaki T, Hirata Y, Kawamura YI, Dohi T.	第43回日本免疫学会総会	京都	2014年12月
Themis regulates cytokine production in mature naive T cells	Okada T, Nitta T, Oda H, Tamehiro N, Patrick MS, Suzuki H	7th ThymOZ meeting	Helon Island, Australia	2014年4月
胸腺皮質上皮細胞による $\gamma$ $\delta$ T細胞の分化制御	新田 剛、室 龍之介、新田 幸子、小田 浩代、鈴木 春巳	第24回 KTCC	京都	2014年6月
RhoH欠損マウスで認められる乾癬様皮膚炎の解析	爲廣紀正、小田浩代、鈴木春巳	第24回 KTCC	京都	2014年6月
Rasal3, a newly identified Ras GTPase activating protein is important for survival of naive T cells in the periphery	Muro R, Nitta T, Okada T, Tubata T, Suzuki H	第43回日本免疫学会総会	京都	2014年12月
Lnk/Sh2b3 adaptor protein controls cytokine responses of dendritic cells, and regulates the induction of IFN- $\gamma$ -producing T cells .	Mori T, Iseki M, Takaki S.	第43回日本免疫学会学術集会	京都	2014年12月
IgM+ plasma cells contribute to the sufficient production of IgG by secreting IL-10 and IL-13.	Yamazaki N, Takaki S.	第43回日本免疫学会学術集会	京都	2014年12月
Lnk/Sh2b family adaptor protein Aps/Sh2b2 in B cells contributes to germinal center B cell survival and optimal IgE production in vivo.	Iseki M, Kudo F, Takaki S.	第43回日本免疫学会学術集会	京都	2014年12月
Suppression of cytokine production from group 2 innate lymphoid cells by interferon- $\gamma$ .	Kudo F, Seki Y, Takaki S.	第43回日本免疫学会学術集会	京都	2014年12月

## 研究発表及び特許取得報告について

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当無し				

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当無し				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。